

# $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对鼠伤寒沙门氏菌的抑制效果及其在湿米粉中的应用

胡瑞琦<sup>1</sup>, 郑钧<sup>2</sup>, 林以琳<sup>1</sup>, 余以刚<sup>1\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广东省农业供给侧结构性改革基金管理有限公司, 广东广州 511457)

**摘要:** 为了研究  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐 ( $\epsilon$ -Poly-Lysine hydrochloride,  $\epsilon$ -PLH) 对鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) 的抑菌作用, 测定最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 和绘制生长曲线评估  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 的抑菌效果。通过碘化丙啶渗透和胞内大分子泄露实验探究  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 细胞膜的作用, 并测定胞内活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 和超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性以及 ATP 酶活性和 ATP 含量, 探究  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 氧化应激和能量代谢的影响。研究发现:  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 有良好抑菌性, MIC 为 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 能够有效抑制 *S. typhimurium* 的生长, 经 MIC  $\epsilon$ -PLH 处理后的 *S. typhimurium* 细胞膜完整性被破坏, 细胞膜渗透性改变, 活性氧过量积累, 处理 6 h 后核酸泄露量和 ROS 水平分别为对照组的 2.45 倍和 1.99 倍, SOD 和 ATP 酶活性以及 ATP 含量分别比对照组下降 29.60%、10.00% 和 67.63%。  $\epsilon$ -PLH 作用于细胞膜, 造成 *S. typhimurium* 氧化损伤, 破坏细菌胞内能量平衡, 进而影响其正常生命活动导致死亡。此外, 将  $\epsilon$ -PLH 应用于湿米粉, 发现  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 仍有一定抑菌效果, 并且具有良好保鲜效果。综上,  $\epsilon$ -PLH 具有控制食品中沙门氏菌污染的潜力。

**关键词:**  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐; 鼠伤寒沙门氏菌; 抑菌效果; 湿米粉

文章编号: 1673-9078(2024)10-219-226

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1316

## Inhibition of *Salmonella typhimurium* Growth by $\epsilon$ -Poly-Lysine Hydrochloride and Its Consequent Use in Wet Rice Noodles

HU Ruiqi<sup>1</sup>, ZHENG Jun<sup>2</sup>, LIN Yilin<sup>1</sup>, YU Yigang<sup>1\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Province Agriculture Supply-Side Structural Reform Fund Management Co. Ltd., Guangzhou 511457, China)

**Abstract:** Here, to investigate the inhibitory effect of  $\epsilon$ -poly-lysine hydrochloride ( $\epsilon$ -PLH) on the growth of *Salmonella typhimurium*, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and the growth curve was plotted. The effect of  $\epsilon$ -PLH on the cell membrane of *S. typhimurium* was investigated by evaluating propidium iodide (PI) infiltration and

引文格式:

胡瑞琦, 郑钧, 林以琳, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对鼠伤寒沙门氏菌的抑制效果及其在湿米粉中的应用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 219-226.

HU Ruiqi, ZHENG Jun, LIN Yilin, et al. Inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by  $\epsilon$ -poly-lysine hydrochloride and its consequent use in wet rice noodles [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 219-226.

收稿日期: 2023-11-01

基金项目: 广州市科技计划项目 (202206010177); 2024 广东省农业农村厅农业科研类及技术推广示范类项目 (2023-440000-58010200-9645)

作者简介: 胡瑞琦 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工技术质量与安全, E-mail: hhuruiqi@163.com

通讯作者: 余以刚 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工技术质量与安全, E-mail: yuyigang@scut.edu.cn

intracellular macromolecule leakage. The effects of  $\epsilon$ -PLH on oxidative stress and energy metabolism in *S. typhimurium* were explored by measuring the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, superoxide dismutase (SOD) and ATPase activities, and ATP content. The results revealed that  $\epsilon$ -PLH exhibits robust antibacterial properties in the context of *S. typhimurium*, with an MIC of 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Further,  $\epsilon$ -PLH was found to effectively inhibit the growth of *S. typhimurium*. Following treatment with  $\epsilon$ -PLH at the MIC, the integrity of the *S. typhimurium* cell membrane was lost, leading to changes in cell membrane permeability and excessive accumulation of ROS. After 6 h of treatment, the levels of nucleic acid leakage and ROS were 2.45 and 1.99 times higher than those in the control group. Further, compared to the control group, the SOD activity, ATPase activity, and ATP content decreased by 29.60, 10.00, and 67.63%, respectively, in the  $\epsilon$ -PLH-treated group.  $\epsilon$ -PLH treatment affected the cell membrane of *S. typhimurium*; this caused oxidative damage and disruption of the intracellular energy balance, ultimately leading to impaired physiological functions and death in *S. typhimurium*. Furthermore, treatment of wet rice noodles with  $\epsilon$ -PLH revealed that  $\epsilon$ -PLH still exhibited an antibacterial effect against *S. typhimurium* and had a good fresh-keeping effect. In conclusion,  $\epsilon$ -PLH exhibits promising potential with respect to the control of *Salmonella* contamination in food.

**Key words:**  $\epsilon$ -poly-lysine hydrochloride; *Salmonella typhimurium*; antibacterial effect; wet rice noodles

沙门氏菌为革兰氏阴性肠道杆菌，是食物中常见致病菌，其中鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌是与人类感染相关的最普遍的血清型，可导致多种疾病<sup>[1]</sup>。沙门氏菌一般多出现在动物性食物当中，如家禽、猪肉和蛋制品<sup>[2]</sup>，但也不能完全忽视其在米面制品中造成的食品安全问题。米粉在中国、东南亚和日本的大部分地区广泛食用，以其独特的风味和口感受到越来越多的欢迎<sup>[3]</sup>。根据市售速冻米面制品微生物污染情况的报道，发现金黄色葡萄球菌、单增李斯特、沙门氏菌、大肠杆菌是导致速冻米面制品产品检出不合格的常见食源性致病菌<sup>[4]</sup>。茂名市茂南区曾因食用受到沙门氏菌污染的凉拌米粉而发生食物中毒事件<sup>[5]</sup>。因此，有效抑制沙门氏菌并防治其在米面制品中的污染是十分具有意义的。

目前，常见的米面制品类产品保鲜方式有添加有机酸、低真空包装结合热杀菌等，但这些手段会对食品感官品质造成影响<sup>[6]</sup>。 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐 ( $\epsilon$ -Poly-Lysine Hydrochloride,  $\epsilon$ -PLH) 主要由链霉菌属发酵所产生，是由多个赖氨酸残基通过  $\alpha$ -羧基和  $\epsilon$ -氨基聚合而成的功能性多肽<sup>[7]</sup>。相比其他化学防腐剂， $\epsilon$ -PLH 更加安全可靠，在人体内可以分解为赖氨酸。 $\epsilon$ -PLH 水溶性好，热稳定性强，在高温条件下不易分解失活，对其抑菌效果也不会产生显著影响，常规食品加工过程中的热处理均可承受，同时，将其应用于食品对感官属性的影响较小<sup>[8]</sup>。 $\epsilon$ -PLH 有广谱抑菌性，具有通过静电吸引与微生物细胞膜结合的能力，破坏膜结构，从而导致细胞死亡<sup>[9]</sup>，对霉菌、酵母菌以及单核增生李斯特菌、蜡

样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O157:H7 等食源性致病菌都具有抑制效果<sup>[10-12]</sup>。然而， $\epsilon$ -PLH 对沙门氏菌的抑菌作用尚未完全阐明。

因此，本文采用碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染色和胞外大分子泄露探究  $\epsilon$ -PLH 对鼠伤寒沙门氏菌细胞膜的损伤作用，通过测定胞内活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 水平和超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性探究  $\epsilon$ -PLH 对鼠伤寒沙门氏菌氧化应激的影响，并以 ATP 酶活性和胞内 ATP 含量评估  $\epsilon$ -PLH 对鼠伤寒沙门氏菌能力代谢的影响。此外，建立了人工污染湿米粉模型以研究  $\epsilon$ -PLH 在湿米粉中的抗菌效果，通过酸度测定和感官评定确定  $\epsilon$ -PLH 对湿米粉的保鲜效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) ATCC 14028 由华南理工大学食品科学与工程学院食品安全与检测实验室保藏；湿米粉购于华南理工大学五山校区南区胜佳超市。

$\epsilon$ -PLH，浙江新银象生物工程有限公司；胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) 培养基、胰酪大豆胨琼脂 (Tryptose Soya Agar, TSA) 培养基，广州环凯微生物有限公司；PI 染液，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate,

DCFH-DA) Sigma-Aldrich; 牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250 白鲨 (Biosharp), 生物科技有限公司; SOD 测定试剂盒、超微量总 ATP 酶试剂盒, 南京建成生物工程研究所; ATP 检测试剂盒, 碧云天生物技术。

## 1.2 主要仪器设备

II 级 A2 型生物安全柜, 赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司; DSX-18L 手提式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; LRH-250A- II 生化培养箱, 韶关泰宏医疗器械有限公司; Cytation5 型多功能酶标仪, 美国 Bio Tek 公司; H1750R 型高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Scientz-IIID 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 菌种活化及培养

用接种环蘸取受试细菌的冻存液, 在 TSA 培养基上以平板划线的方式接种, 将平板倒置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 24 h 获得清晰的单菌落。挑取单菌落接种于 20 mL 无菌 TSB 培养基中, 随后置于恒温振荡培养箱中 (37 °C, 180 r/min) 培养 12 h 使细菌生长至稳定期。

### 1.3.2 最小抑菌浓度的测定

用无菌水将  $\epsilon$ -PLH 配制质量浓度为 2.56 mg/mL 的溶液, 并过 0.22  $\mu$ m 的滤膜除菌, 再将其稀释到 2 048  $\mu$ g/mL 作为储备液。用无菌生理盐水将培养至稳定期的菌悬液稀释到约为 6 log CFU/mL 备用。

采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。首先, 在 96 孔板中各加入 100  $\mu$ L 无菌 TSB 培养基, 再向首列孔中加入 100  $\mu$ L  $\epsilon$ -PLH 储备液, 混匀后依次取 100  $\mu$ L 到下一孔中进行梯度稀释, 倒数第二列不加  $\epsilon$ -PLH 作为阴性对照, 然后将约 6 log CFU/mL 的菌悬液加入 100  $\mu$ L 至各孔中并混匀, 最后一列不加菌悬液作为阳性对照。将 96 孔板转移至 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 通过测定 OD<sub>600 nm</sub> 判断最小抑菌浓度, 吸光值明显降低的最低抑制浓度为 MIC。

### 1.3.3 生长曲线的测定

按 2.3.2 中方法配制  $\epsilon$ -PLH 溶液, 将过夜培养的菌悬液用无菌 TSB 培养基稀释至约 6 log CFU/mL,

加入  $\epsilon$ -PLH 溶液, 使之最终质量浓度分别为 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC, 对照组加入等量无菌水。上述样品置于恒温振荡培养箱中 (37 °C, 180 r/min) 培养 24 h, 分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、20 和 24 h 取样于 96 孔板中测定 OD<sub>600 nm</sub>, 以培养时间为横坐标, OD<sub>600 nm</sub> 为纵坐标, 绘制生长曲线。

### 1.3.4 细胞膜完整性分析

PI 染色实验参照 Tang 等<sup>[13]</sup>的方法并进行适当修改。收集过夜培养的菌体并用无菌生理盐水洗涤三次后, 加入不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 溶液 (1/2 MIC、MIC、2 MIC) 重悬菌体, 对照组加入等量无菌水, 在恒温振荡培养箱中 (37 °C, 180 r/min) 孵育 6 h 后, 离心 (8 000 g, 3 min) 收集菌体沉淀, 用无菌生理盐水洗涤三次后, 加入 10  $\mu$ g/mL 的 PI 染液重悬菌体, 将上述样品置于 37 °C 恒温培养箱中避光染色 30 min 后, 再次离心 (8 000 g, 3 min) 收集菌体沉淀, 用无菌生理盐水洗涤三次去除未进入细菌细胞内的 PI 染液, 最后用无菌生理盐水重悬菌体, 取样于黑色 96 孔板中并用酶标仪进行荧光光谱扫描, 激发波长 495 nm, 发射波长 550~700 nm, 步幅为 5 nm。

### 1.3.5 胞内大分子泄露

参考 Su 等<sup>[14]</sup>的方法测定细菌细胞外核酸量。取生长至对数期的菌悬液, 同 1.3.4 洗涤菌体并重悬, 将受到不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 胁迫的样品置于恒温振荡培养箱中 (37 °C, 180 r/min) 培养, 分别于 0、2、4 和 6 h 取样, 离心 (8 000 g, 3 min) 收集上清液, 使用紫外分光光度计测定 OD<sub>260 nm</sub>。

### 1.3.6 ROS 水平

细菌胞内 ROS 水平测定根据 Gu 等<sup>[15]</sup>报道的方法并略有改动。过夜培养的菌悬液并稀释至约 7 log CFU/mL, 同 1.3.4 洗涤菌体并重悬, 将受到不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 胁迫的样品置于恒温振荡培养箱中 (37 °C, 180 r/min) 反应 6 h 后, 离心 (8 000 g, 3 min) 收集菌体沉淀, 用无菌生理盐水洗涤三次后, 将菌体沉淀重悬于 DCFH-DA 中, 将上述样品置于 37 °C 恒温培养箱中避光孵育 30 min, 反应结束后用无菌生理盐水洗涤三次并重悬, 取样于黑色 96 孔板中测定荧光强度, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。同时测定 OD<sub>600 nm</sub> 以确定细菌数量。ROS 水平通过细菌数量归一化。

### 1.3.7 SOD酶活测定

同 1.3.4 使菌体在不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 下反应 6 h, 收集菌体沉淀并清洗, 最后重悬于无菌生理盐水。超声破碎 (功率 20%, 5 min) 上述细菌细胞使用超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, A001-3) 测定 SOD 活性并采用考马斯亮蓝法测定样品中的蛋白。

### 1.3.8 ATP酶活测定

细菌前处理方式同 1.3.7, 样品超声破碎后使用超微量总 ATP 酶测试盒 (南京建成生物工程研究所, A070-1) 依次进行酶促反应和定磷反应测定 ATP 酶活力, 同时采用考马斯亮蓝法测定样品中的蛋白。

### 1.3.9 ATP水平

参考 Wu 等<sup>[6]</sup>的方法进行 ATP 的测定, 用不同质量浓度 (0、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC)  $\epsilon$ -PLH 溶液胁迫培养至对数期的菌体 6 h 后, 去上清, 用 PBS 清洗三次后收集菌体。使用 ATP 检测试剂盒 (碧云天生物技术, S0026) 对细菌细胞进行裂解并测定 ATP 浓度, 同时采用考马斯亮蓝法测定样品中的蛋白。

### 1.3.10 $\epsilon$ -PLH在湿米粉中的应用

#### 1.3.10.1 $\epsilon$ -PLH对湿米粉中 *S. typhimurium* 的抑制效果

将湿米粉在沸水浴中灭菌 40 min 以去除背景菌<sup>[17]</sup>, 沥干冷却至室温后接种 *S. typhimurium*, 使之初始菌落数约为 2~3 log CFU/g。染菌后的湿米粉随机分为四组, 分别在 2 MIC、MIC 和 1/2 MIC 质量浓度的  $\epsilon$ -PLH 溶液和无菌水中浸泡 3 min 后捞出沥干, 用无菌采样袋密封包装后, 置于 37 °C 条件下贮藏并定时取样测定菌落数。

#### 1.3.10.2 酸度

参照 GB5009.239-2016《食品酸度的测定》并略有改动。取 5 g 湿米粉置于 250 mL 具塞磨口锥形瓶中, 加入 10 mL 蒸馏水充分研磨匀浆后, 再加入 40 mL 蒸馏水, 滴入三氯甲烷 5 滴, 加塞后摇匀, 震荡浸提 70 min 后过滤, 收集滤液进行滴定。

#### 1.3.10.3 感官评定

各组湿米粉于 37 °C 保存 10 h 经蒸煮后进行感官评定。由 10 名食品专业人员对色泽、色泽、气味、

口感进行综合评价。湿米粉感官评定标准见表 1。

表 1 湿米粉感官评定标准

| 评价指标       | 评价标准                     | 分值  |
|------------|--------------------------|-----|
| 色泽<br>(5分) | 米白色, 颜色均匀且有光泽, 无杂色       | 4~5 |
|            | 米白色, 颜色略暗, 略有杂色          | 2~4 |
|            | 失去原有的米白色, 颜色偏深且暗淡, 有明显杂色 | 1~2 |
| 形态<br>(5分) | 表面光滑, 无粘连, 有弹性           | 4~5 |
|            | 表面平整, 无明显粘连现象, 有弹性       | 2~4 |
|            | 表面粗糙, 粘稠易粘连, 无弹性易断       | 1~2 |
| 气味<br>(5分) | 有米香味, 无异味                | 4~5 |
|            | 略有米香, 无明显酸味、异味           | 2~4 |
|            | 无米香, 有酸味、异味              | 1~2 |
| 口感<br>(5分) | 柔软爽滑, 弹性适中, 不粘牙          | 4~5 |
|            | 柔软, 弹性稍差, 不粘牙            | 2~4 |
|            | 松散不清爽, 弹性差, 粘牙           | 1~2 |

### 1.3.11 数据分析

本研究实验均重复三次取平均值。采用 Origin 2019 软件绘图, 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学意义分析,  $P < 0.05$  为显著性检验标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\epsilon$ -PLH对 *S. typhimurium* 的 MIC 及其对生长曲线的影响

$\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 的 MIC 如图 1a 所示。当  $\epsilon$ -PLH 质量浓度为 128  $\mu\text{g/mL}$  时, 其  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明对 *S. typhimurium* 有明显抑制作用, 由此可以判断  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 的 MIC 为 128  $\mu\text{g/mL}$ 。

在图 1b 中展示了在不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 处理下 *S. typhimurium* 的生长曲线。与对照组相比, 当  $\epsilon$ -PLH 质量浓度为 1/2 MIC 时, 细菌生长延迟, 固定相细菌密度有所降低, 说明该质量浓度的  $\epsilon$ -PLH 对细菌的生长仍有一定的影响。当  $\epsilon$ -PLH 质量浓度高于 MIC 时, 光密度值基本没有增长, 表明此时  $\epsilon$ -PLH 能有效抑制细菌生长。

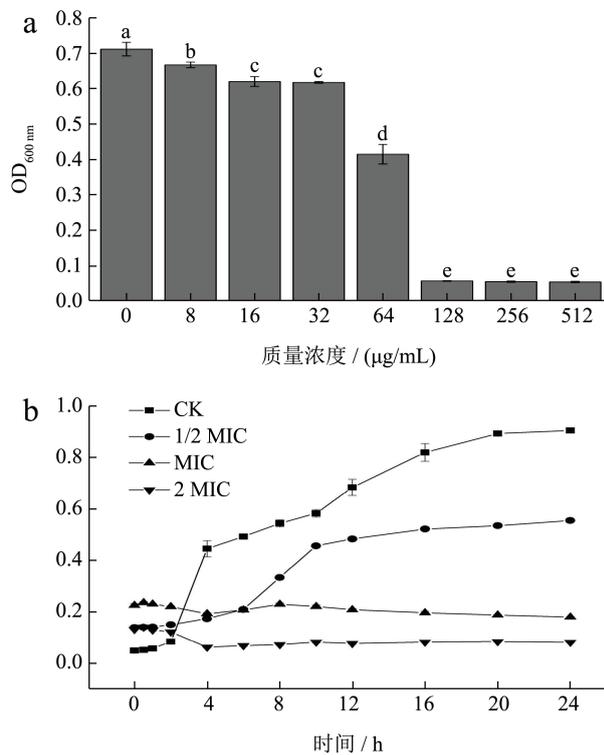


图1  $\epsilon$ -PLH对 *S. typhimurium* 的 MIC (a) 及其对生长曲线 (b) 的影响

Fig.1 The MIC of  $\epsilon$ -PLH against *S. typhimurium* (a) and the effect of  $\epsilon$ -PLH on the growth curve (b) of *S. typhimurium*

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 $\epsilon$ -PLH对 *S. typhimurium* 细胞膜的影响

PI 不能进入活细胞, 只能穿透受损细胞膜并与 DNA 相互作用, 从而在特定激发波长下发出红色荧光。如图 2a 所示, 对照组的荧光强度明显低于其他三个处理组, 处理组的荧光强度随  $\epsilon$ -PLH 质量浓度的增加而增加, 当质量浓度达到 MIC 时, 荧光强度显著增强。这说明  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 的膜损伤具有剂量依赖性。对照组仍有一定程度的荧光强度, 可能是因为在培养过程中发生的自然凋亡。Tan 等<sup>[18]</sup>在研究  $\epsilon$ -PL 对金黄色葡萄球菌的影响时也出现了类似趋势的实验结果。由此可以推断,  $\epsilon$ -PLH 能穿过细胞壁, 作用于细胞膜并破坏细胞完整性。

核酸是细菌细胞中存在的重要生命物质, 当细菌细胞膜受损时, 核酸会从细胞质中释放。如图 2b 所示为  $\epsilon$ -PLH 处理后 *S. typhimurium* 的核酸释放结果。随着处理时间的延长, 对照组和处理组的 OD<sub>260 nm</sub> 值均有所增长, 但在趋势上存在一定差异。所有样品的 OD<sub>260 nm</sub> 值初始水平无显著差异, 对照组在 6 h 时 260 nm 处吸光度仅从 0.02 上升到 0.11。  $\epsilon$ -PLH 处理组中 2MIC 组的上升速度最快, 其细菌

培养上清液 OD<sub>260 nm</sub> 值在 6 h 时增加到了 0.27。结果表明,  $\epsilon$ -PLH 能够诱导细菌细胞的核酸渗漏, 并呈时间和剂量依赖性增加。许多其他抗菌剂也表现出类似的作用, 例如, Wang 等<sup>[19]</sup>报道生姜精油直接作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞膜细胞膜, 破坏细胞膜结构, 进而增加细胞膜通透性, 导致胞内蛋白质和核酸从细胞中泄漏, 从而使细菌失去其基本结构功能, 最终在一定浓度下导致细菌细胞死亡。

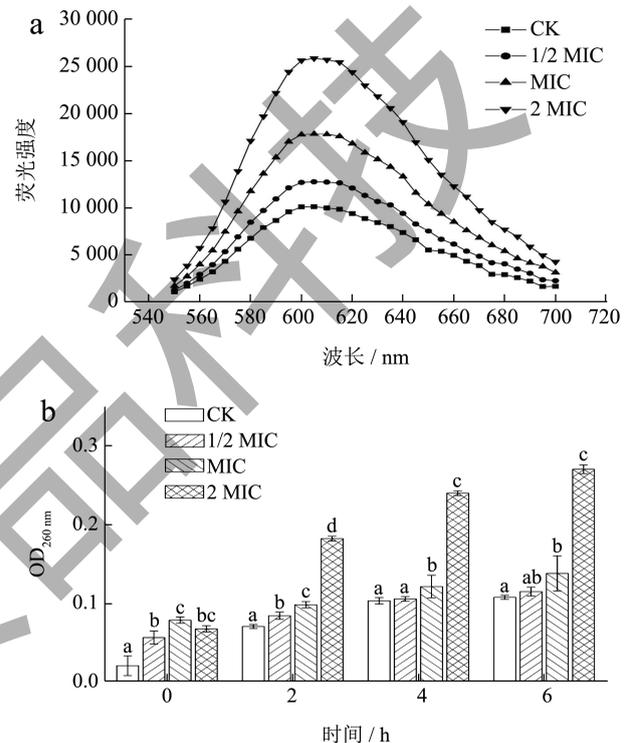


图2  $\epsilon$ -PLH 作用下 *S. typhimurium* 的荧光光谱图 (a) 和胞内核酸泄露 (b)

Fig.2 Fluorescence spectra (a) and intracellular nucleic acid leakage (b) of *S. typhimurium* under  $\epsilon$ -PLH

注: 不同的小写字母表示同一时间不同组间具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 $\epsilon$ -PLH对 *S. typhimurium* 氧化应激的影响

以 525 nm 处的荧光强度表示 ROS 的产生量, 反映内源性氧化应激对细菌的损伤程度<sup>[20]</sup>。当用  $\epsilon$ -PLH 处理 *S. typhimurium* 6 h 后, 细胞内 ROS 呈剂量依赖性增加 (图 3a)。  $\epsilon$ -PLH 处理 *S. typhimurium* 细胞 ROS 生成分别是对照组的 1.96 倍 (1/2 MIC)、1.99 倍 (MIC)、2.20 倍 (2 MIC) 和 2.24 倍 (4 MIC)。这一现象与丁香酚处理创伤弧菌的趋势类似<sup>[21]</sup>, ROS 水平显著增高 ( $P < 0.05$ ) 且呈浓度依赖性。有研究表明, ROS 会攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸,

引起脂质过氧化，最终导致细胞膜破坏，从而诱导细胞凋亡<sup>[22]</sup>。结合细胞膜完整性和通透性的检测结果，可以推断，ROS 是  $\epsilon$ -PLH 抗菌作用的重要介质，ROS 水平的升高极有可能通过膜介导的凋亡途径，造成氧化损伤，导致 *S. typhimurium* 细胞死亡。

SOD 在细菌细胞防御氧化应激反应中起关键作用<sup>[23]</sup>。图 3b 显示，经  $\epsilon$ -PLH 处理后，SOD 活性均有不同程度的降低，与对照组相比，1/2 MIC 组 SOD 活性并没有发生显著下降，MIC 组 SOD 活性仅下降 9.19%，而 2 MIC 和 4 MIC 组 SOD 活性分别下降 33.06% 和 47.05%。Vatansever 等<sup>[24]</sup>认为过量的 ROS 会破坏细菌体内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的防御系统。由此推测，可能是由于  $\epsilon$ -PLH 处理后细菌细胞产生的 ROS 量过高，无法被 SOD 等胞内抗氧化酶淬灭，这些 ROS 可能通过氧化使 SOD 活力下降。

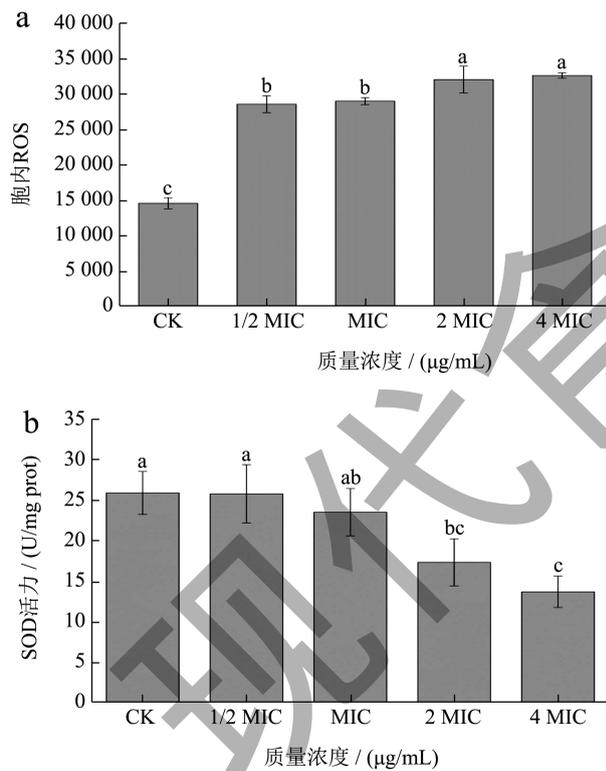


图3  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 胞内 ROS 水平 (a) 和 SOD 活力 (b) 的影响

Fig.3 The effect of  $\epsilon$ -PLH on intracellular ROS levels (a) and SOD activity (b) of *S. typhimurium*

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

综上所述，经  $\epsilon$ -PLH 处理后，*S. typhimurium* 细胞内产生大量自由基，ROS 水平显著升高，造成胞内关键抗氧化酶活降低，自由基清除系统的受损，细胞发生氧化应激反应，导致 *S. typhimurium* 细胞死亡。

#### 2.4 $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 能量代谢的影响

ATP 酶在微生物能量代谢中发挥着重要作用，它可以催化 ATP 水解，为细胞内其他化学反应提供能量。如图 4a 所示，不同质量浓度  $\epsilon$ -PLH 处理 *S. typhimurium* 6 h 后，1/2 MIC 和 MIC 处理组的 ATP 酶活性分别为 2.35 U/mg prot 和 2.25 U/mg prot，均与对照组无显著差异。而 2 MIC 和 4 MIC 处理组的 ATP 酶活性较对照组分别降低了 24.55% 和 36.27%。Fang 等<sup>[25]</sup>发现  $\epsilon$ -PLH 能显著降低单增李斯特菌 ATP 酶活性并呈浓度依赖。细胞膜负责细胞能量的转化以及各种酶的分泌<sup>[26]</sup>，当细菌细胞膜受损时，可引起 ATP 酶活性的下降。

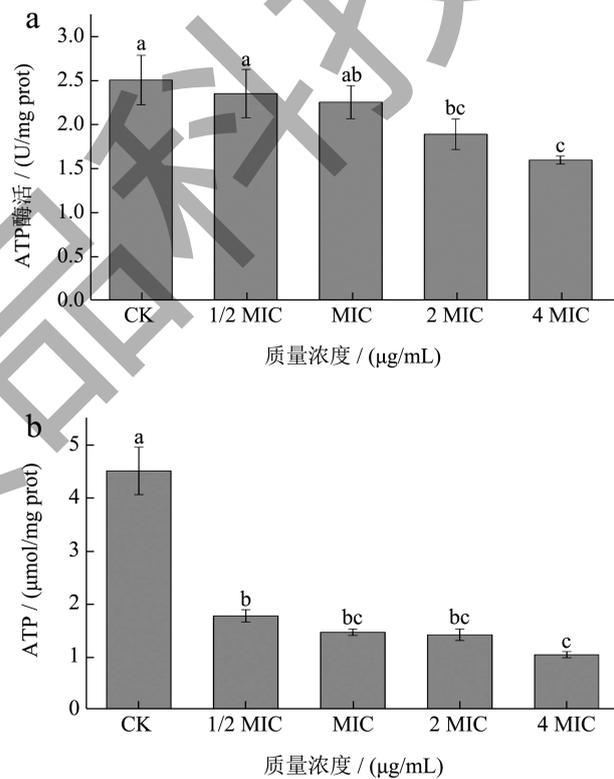


图4  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 胞内 ATP 酶活力 (a) 和胞内 ATP (b) 水平的影响

Fig.4 The effect of  $\epsilon$ -PLH on intracellular ATPase activity (a) and ATP levels (b) in *S. typhimurium*

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

ATP 具有获取、储存和运输能量的功能，其含量的变化与细胞能量代谢直接相关。如图 4b 所示，与对照组相比，不同质量浓度的  $\epsilon$ -PLH 处理 *S. typhimurium* 后，ATP 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )，2MIC 和 4MIC 组细胞内 ATP 分别下降 68.51% 和 76.94%。该实验现象与 Zhang 等<sup>[27]</sup>使用肉桂精油处理肠炎沙门氏菌的结果相似，这可能是由于 ATP 合

成的减少和水解速率的增加<sup>[28]</sup>,也可能是由于细胞膜通透性改变导致 ATP 泄漏<sup>[29]</sup>。

以上结果表明,较高质量浓度的  $\epsilon$ -PLH 在 *S. typhimurium* 的 TCA 循环和糖酵解过程中均可能引起代谢阻滞。 $\epsilon$ -PLH 能够抑制 *S. typhimurium* 胞内 ATP 酶活性,降低细菌中 ATP 的含量,导致细菌生命活动所需的能量不足,从而影响细菌代谢活动。

## 2.5 $\epsilon$ -PLH在湿米粉中的应用

### 2.5.1 $\epsilon$ -PLH对湿米粉中*S. typhimurium*的抑制效果

为了探索  $\epsilon$ -PLH 在食品基质中对 *S. typhimurium* 的抑菌效果,在 37 °C 条件下建立了人工污染湿米粉模型。接种了 *S. typhimurium* (2~3 log CFU/g) 的样品用不同质量浓度的  $\epsilon$ -PLH 浸泡,在整个贮藏期内用  $\epsilon$ -PLH 处理过的湿米粉中 *S. typhimurium* 数量始终低于对照组(图 5)。在 37 °C 条件下,对照组的 *S. typhimurium* 数量在 12 h 后就增加到了 7.38 log CFU/g (图 5),经 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 的  $\epsilon$ -PLH 处理的湿米粉中 *S. typhimurium* 数量在 24 h 后分别为 4.41、3.57 和 3.75 log CFU/g,均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。这一结果表明,用  $\epsilon$ -PLH 浸泡可以抑制湿米粉中 *S. typhimurium* 的生长繁殖,魏奇等<sup>[7]</sup>发现质量浓度为 0.30 g/L 的  $\epsilon$ -PLH 能够显著抑制双孢蘑菇表面假单胞菌的生长,提高双孢蘑菇品质,延长其贮藏期。因此, $\epsilon$ -PLH 在复杂食品基质仍具有抗菌潜力。

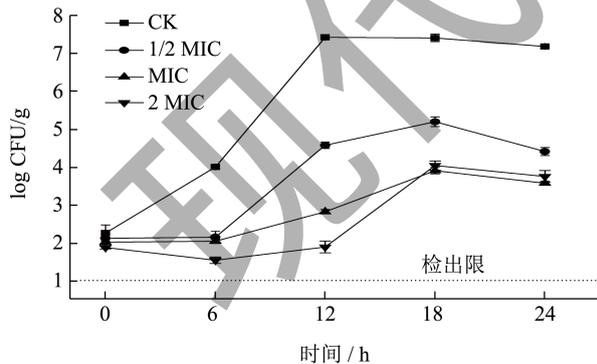


图 5  $\epsilon$ -PLH 对湿米粉中 *S. typhimurium* 的抑制作用

Fig.5 Inhibition of  $\epsilon$ -PLH on *S. typhimurium* in wet rice noodles

### 2.5.2 $\epsilon$ -PLH对湿米粉的保鲜效果

由图 6a 可以看出各组湿米粉样品在 37 °C 储存温度下均随时间延长而逐渐增加,可能是因为微生物的生长代谢活动利用了湿米粉中的碳水化合物和蛋白质等物质并产酸。与对照组相比,处理组的酸

度增长均有不同程度的延缓。感官属性是评估食品食用性的重要指标。如图 6b 所示,各组色泽和形态分数较为接近,差异主要在口感和气味两个方面。1/2 MIC 在口感上优于对照组,但气味得分与对照组接近。MIC 和 2 MIC 处理组口感和气味得分接近,均明显优于对照组。湿米粉含水量较高,微生物在适宜温度下极易繁殖,导致湿米粉产生令人不愉快的酸味,结构也因淀粉等物质的分解被破坏,使食用口感受到影响<sup>[6]</sup>。由此可以看出, $\epsilon$ -PLH 可以延缓湿米粉酸度的增长和食用品质的下降,这可能与  $\epsilon$ -PLH 对微生物的抑制有关。

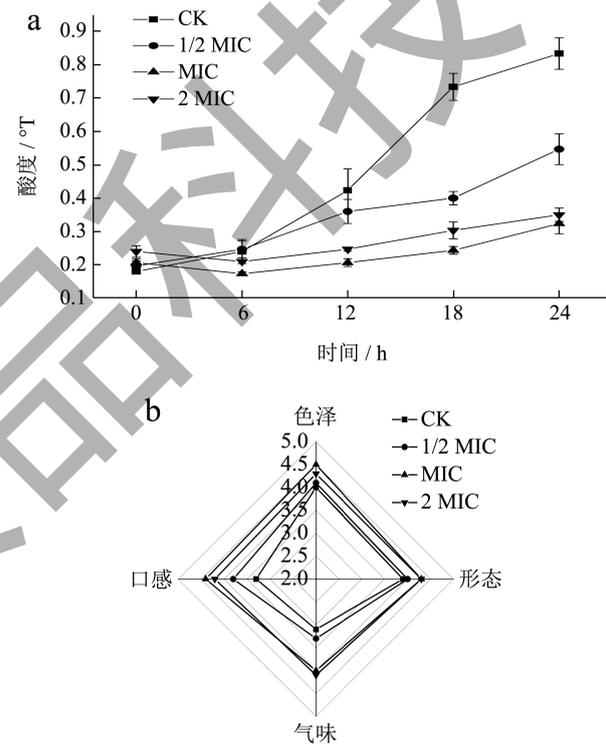


图 6  $\epsilon$ -PLH 对湿米粉酸度 (a) 和感官评定 (b) 的影响

Fig.6 Effect of  $\epsilon$ -PLH on acidity (a) and sensory evaluation (b) of wet rice noodles

## 3 结论

$\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 有良好抑菌效果,其 MIC 为 128  $\mu$ g/mL,  $\epsilon$ -PLH 对 *S. typhimurium* 的抗菌作用涉及多个靶点,包括细胞膜以及重要的细胞内成分。 $\epsilon$ -PLH 可以造成 *S. typhimurium* 的细胞膜受损,影响细胞膜的完整性,改变细胞膜的通透性,导致细胞内物质的渗漏。 $\epsilon$ -PLH 能够刺激 *S. typhimurium* 产生 ROS,过量的 ROS 会驱动氧化应激反应,导致 SOD 酶活性降低,使 *S. typhimurium* 抗氧化防御系统失效,导致细胞膜的进一步损伤。此外, $\epsilon$ -PLH

可能通过阻碍能量代谢途径或膜损伤致使 ATP 酶活性下降和 ATP 损失, 从而破坏了 *S. typhimurium* 细胞内的能量平衡, 影响细菌细胞的正常代谢活动。此外, 在湿米粉中  $\epsilon$ -PLH 仍对 *S. typhimurium* 表现出了明显的抗菌活性, 利用  $\epsilon$ -PLH 处理湿米粉, 能够延缓湿米粉在 37 °C 储存条件下酸度的增长, 维持湿米粉良好的感官品质, 显示出了其在米制品应用中的较大潜力。

### 参考文献

- [1] LOPEZ-ROMERO J C, VALENZUELA-MELENDRÉS M, JUNEJA V K, et al. Effects and interactions of gallic acid, eugenol and temperature on thermal inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken [J]. *Food Research International*, 2018, 103: 289-294.
- [2] EHUWA O, JAISWAL A K, JAISWAL S. Salmonella, food safety and food handling practices [J]. *Foods*, 2021, 10(5): 907.
- [3] WEI X, CONGNAN Z, KANG W, et al. Understanding the deterioration of fresh brown rice noodles from the macro and micro perspectives [J]. *Food Chemistry*, 2020, 342: 128321.
- [4] 骆玉婷. 米面制品中食源性微生物代谢增殖及 VBNC 的形成规律研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [5] 陈跃华, 吴柏峰, 林坤立, 等. 一起凉拌米粉引起的沙门氏菌食物中毒的调查报告[J]. *实用预防医学*, 2007, 14(2): 443.
- [6] 董宏浩, 徐丽, 全珂, 等. 鲜湿米粉品质劣变机理及保鲜技术研究进展[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(3): 161-165.
- [7] 魏奇, 李婕, 刘蓓蓓, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对贮藏期间双孢蘑菇表面微生物生长和保鲜的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(3): 256-264.
- [8] YE ZHI F, PREETAM S, ARUN K B, et al. Delivery systems of antimicrobial compounds to food [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 57: 165-177.
- [9] RODRIGUES B, MORAIS T P, ZAINI P A, et al. Antimicrobial activity of epsilon-poly-L-lysine against phytopathogenic bacteria [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11324.
- [10] YE R, XU H, WAN C, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2013, 439(1): 148-153.
- [11] CHANG S, LU W Y W, PARK S H, et al. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by epsilon-polylysine [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(3): 236-241.
- [12] 许超群, 陈飞平, 梁旭茹, 等. 肉桂醛与  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐的抑菌活性及其协同抑菌机制初探[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(7): 24-31.
- [13] TANG H, CHEN W, DOU Z, et al. Antimicrobial effect of black pepper petroleum ether extract for the morphology of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* [J]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2017, 54(7): 2067-2076.
- [14] SU R, LI T, FAN D, et al. The inhibition mechanism of epsilon-polylysine against *Bacillus cereus* emerging in surimi gel during refrigerated storage [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(6): 2922-2930.
- [15] GU Y, DONG J, LI J, et al. Antibacterial activity and mechanism of sanguinarine against *Staphylococcus aureus* by interfering with the permeability of the cell wall and membrane and inducing bacterial ROS production [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1121082.
- [16] WU M, TIAN L, FU J, et al. Antibacterial mechanism of protocatechuic acid against *Yersinia enterocolitica* and its application in pork [J]. *Food Control*, 2022, 133: 108573.
- [17] 张玮, 陈洁, 陈玲. 杀菌工艺对鲜湿米粉的保鲜效果及品质的影响[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(5): 32-37.
- [18] TAN Z, SHI Y, XING B, et al. The antimicrobial effects and mechanism of  $\epsilon$ -poly-lysine against *Staphylococcus aureus* [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2019, 6(11): 1-10.
- [19] WANG X, SHEN Y, THAKUR K, et al. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3955.
- [20] LAN W, CHEN X, ZHAO Y, et al. Insights into the antibacterial mechanism of ozone water combined with tea polyphenols against *Shewanella putrefaciens*: membrane disruption and oxidative stress [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022, 57(11): 7423-7433.
- [21] LUO K, KANG S, GUO M, et al. Evaluation of the antibacterial mechanism and biofilm removal effect of eugenol on *Vibrio vulnificus* and its application in fresh oysters [J]. *Food Bioscience*, 2022, 50: 102103.
- [22] ZHANG L, ZHANG L, XU J. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 8876.
- [23] FANG Z, XU L, LIN Y, et al. The preservative potential of octopus scraps peptides-zinc chelate against *Staphylococcus aureus*: its fabrication, antibacterial activity and action mode [J]. *Food Control*, 2019, 98: 24-33.
- [24] VATANSEVER F, DE MELO W C M A, AVCI P, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(6): 955-989.
- [25] FANG J, HONG X, LU H, et al. Antibacterial and anti-biofilm of epsilon-poly-lysine hydrochloride on *Listeria monocytogenes* and its application on refrigerated beef [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(10): e16915.
- [26] HE S, CUI Y, DONG R, et al. Global transcriptomic analysis of ethanol tolerance response in *Salmonella enteritidis* [J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 798-806.
- [27] ZHANG Z, ZHAO Y, CHEN X, et al. Effects of cinnamon essential oil on the physiological metabolism of *Salmonella enteritidis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1035894.
- [28] ZENG Y, YU Q, CHENG S. Antibacterial mechanism of liangguoan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(7): 4025-4032.
- [29] TIAN L, WANG X, LIU R, et al. Antibacterial mechanism of thymol against *Enterobacter sakazakii* [J]. *Food Control*, 2021, 123: 107716.